

**Metode uji residu antibiotik secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada ikan dan udang -  
Bagian 2: *Aminohydantoin* (AHD)**





© BSN 2010

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan .....	3
5 Bahan .....	3
6 Prosedur kerja .....	3
7 Perhitungan .....	5
8 Pengendalian mutu.....	5
Lampiran A (normatif) Pembuatan larutan.....	6
Lampiran B (normatif) Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis AHD .....	7
Lampiran C (normatif) Posisi standar AHD dan contoh pada well dan kurva kalibrasi standar AHD .....	8
Bibliografi .....	9
Gambar B.1 - Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis AHD.....	7
Gambar C.1 - Kurva kalibrasi standar AHD.....	8
Tabel C.1 – Susunan standar AHD dan contoh dalam well.....	8



## Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas, dan memberikan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Metode uji residu antibiotik secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada ikan dan udang - Bagian 2: *Aminohydantoin* (AHD).

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya. Standar ini telah dibahas dalam rapat teknis dan terakhir disepakati dalam rapat konsensus SPT 65-05-S2 Perikanan Budidaya pada tanggal 14 September 2009 di Bandung, dihadiri oleh anggota subpanitia teknis, wakil-wakil dari unsur pemerintah, produsen, konsumen, pembudidaya, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya melalui serta telah memperhatikan:

1. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
2. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep. 01/Men/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.
5. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.01/Men/2007 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
6. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.02/Men/2007 tentang Monitoring Residu Obat, Bahan Kimia, Bahan Biologis dan Pencemaran Pada Pembudidayaan Ikan.
7. Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. 07/DPB/HK.150.154/S4/VII/2007 tentang Batas Maksimum Residu Obat Ikan, Peptisida dan Kontaminan Pada Bahan Makanan Yang Berasal Dari Ikan.
8. Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. No. 06/DPB/HK.150/S4/VII/2007 tentang Pedoman Pelaksanaan Monitoring Residu Obat, Bahan Kimia, Bahan Biologi.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 22 Desember 2009 sampai dengan 22 Pebruari 2010 dengan hasil akhir RASNI.



## Metode uji residu antibiotik secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada ikan dan udang - Bagian 2: *Aminohydantoin* (AHD)

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan pengujian residu *Aminohydantoin* (AHD) pada ikan dan udang dengan menggunakan metode *enzyme linked immunoassay* (ELISA).

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **absorbansi**

penyerapan cahaya oleh partikel dalam suatu larutan dalam sistem optik pada ELISA reader

#### 2.2

##### ***aminohydantoin* (AHD)**

*derivate nitrofurantoin*

#### 2.3

##### **antibiotik**

zat kimia dengan sifat antimikroba, dihasilkan oleh mikroorganisme, tumbuhan, atau hewan yang lebih tinggi dan juga secara sintetik

#### 2.4

##### **antibodi**

molekul *imunoglobulin* yang mempunyai suatu rantai asam amino spesifik, hanya berinteraksi dengan antigen yang menginduksi sintesis molekul ini di dalam sel dari seri limfoid (khususnya sel plasma), atau dengan antigen yang erat hubungannya dengan antigen tersebut

#### 2.5

##### **antigen**

benda asing yang menyebabkan pembentukan antibodi bila dimasukkan ke dalam organisme. Antigen bisa berupa toksin dari bakteri, enzim, protein hewani dan nabati lain, atau sel nabati dan hewani

#### 2.6

##### **contoh ikan dan udang**

sejumlah kecil dari suatu populasi ikan/udang yang digunakan untuk pemeriksaan dan memenuhi persyaratan secara statistika

#### 2.7

##### ***dilution factor***

faktor pengenceran yang diperoleh dari penambahan volume larutan pengencer

#### 2.8

##### **ekstraksi**

proses pemisahan senyawa diantara dua fase zat yang tidak bercampur



**2.9**

**enzim**

protein yang bertindak sebagai katalis biologis berfungsi mempercepat reaksi kimia di dalam jaringan organisme

**2.10**

***enzyme conjugated***

enzim terikat

**2.11**

***enzyme linked immunoassay (ELISA)***

teknik biokimia yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur suatu antibodi maupun antigen pada suatu contoh daging dari ikan/udang

**2.12**

**evaporasi**

proses penguapan yaitu proses perubahan molekul zat cair menjadi gas atau uap air

**2.13**

**inkubasi**

pemeliharaan organisme, campuran reaksi, dan semacamnya dalam lingkungan temperatur yang sesuai dan konstan selama kurun waktu tertentu agar tercapai hasil/akibat tertentu

**2.14**

**metabolit**

substansi yang memiliki ukuran molekul kecil yang merupakan produk antara maupun akhir dari suatu proses metabolisme, dan pada umumnya produk tersebut masih tetap ada pada saat akhir metabolisme

**2.15**

**sentrifus**

alat untuk mengendapkan partikel dengan berat molekul rendah dengan cara pemutaran pada kecepatan tinggi

**2.16**

***TMB substrate***

larutan 3,3',5,5' Tetramethyl benzidine

**2.17**

**well**

lubang sumuran pada *microtiter plate* yang berisi antigen

**3 Prinsip**

Metode ini berdasarkan deteksi metabolit *nitrofurantoin* (AHD) pada ikan dan udang dengan prinsip "*indirect – competitive*" *enzyme immunoassay*. *Microtiter well* dilapisi oleh *Bovine Serum Albumin (BSA)-linked antigen*. AHD yang terdapat di dalam contoh berikatan dengan antigen, setelah penambahan *horseradish peroxidase* (HRP), (TBM)/*peroxidase substrate* kemudian larutan contoh diukur dengan *ELISA reader*. Nilai absorpsi berbanding terbalik dengan konsentrasi AHD di dalam contoh.



## 4 Peralatan

- a) blender;
- b) evaporator (*nitrogen evaporator*);
- c) inkubator;
- d) karet pipet (*rubber pipette bulb*);
- e) labu ukur (*volumetric flask*) 100 ml, dan 500 ml;
- f) lemari pembeku (*freezer*);
- g) *microtiter plate reader*/ELISA reader (panjang gelombang 450 nm/630 nm);
- h) *mini mixer*;
- i) pipet ukur (*graduated pipette*) 10 ml;
- j) pengaduk (*homogenizer*);
- k) pipet mikro (*micropipettes*) :20 µl sampai dengan 200 µl, 100 µl sampai dengan 1000 µl, 250 µl *multi-channel pipette*;
- l) sentrifus;
- m) *shaker*;
- n) tabung reaksi (*glass test tube*) 10 ml;
- o) tabung sentrifus polistiren (*polystyrene centrifuge tube*) 50 ml;
- p) tabung sentrifus;
- q) timbangan analitik.

## 5 Bahan

### 5.1 Bahan kimia

- a) akuabides;
- b) *ethyl acetate Grade Reagent* (G.R);
- c) HCl G.R;
- d) metanol G.R;
- e) NaOH G.R;
- f) *n-Hexane* G.R;
- g) Nitrogen H.P (*High Purity*);
- h) *potassium phosphate dibasic trihydrate* ( $K_2HPO_4 \cdot H_2O$ ) G.R.

### 5.2 Bahan ELISA kits

- a) *antibody solution*;
- b) *20xconcentrated wash solution*;
- c) *2xconcentrated extraction solution*;
- d) *enzyme conjugated*;
- e) larutan standar AHD dengan konsentrasi: 100 ng/ml;
- f) *microtiter plate* yang telah dilapisi dengan *coupling antigen*;
- g) *2-Nitrobenzaldehyde*;
- h) larutan standar AHD (0; 0,1; 0,3; 0,9; 2,7; dan 8,1) ng/ml;
- i) *solution A*;
- j) *solution B*;
- k) *stop solution*;

**CATATAN** Pembuatan larutan diuraikan dalam Lampiran A.

## 6 Prosedur kerja

### 6.1 Preparasi contoh daging ikan/udang

- a) lumatkan contoh ( $\pm$  250 gram) dengan blender hingga homogen;



- b) simpan contoh yang telah homogen pada wadah yang bersih dan tertutup;
- c) jika contoh tidak langsung diuji maka simpan dalam *freezer* sampai analisa akan dilakukan.

## 6.2 Ekstraksi

- a) Timbang 1 g homogenat contoh ke dalam tabung sentrifus dan tambahkan 5 ml metanol, aduk selama 5 menit, kemudian sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 4500 rpm (3000 g,  $r = 10$  cm) lalu buang seluruh lapisan bagian atas.
- b) Tambahkan endapan dengan 4 ml akuabides, 0,5 ml HCl 1 M, dan 100  $\mu$ l 2-*Nitrobenzaldehyde* kemudian kocok selama 1 menit dengan menggunakan *mini mixer*.
- c) Inkubasikan pada suhu 37 °C selama 16 jam.
- d) Tambahkan 5 ml  $K_2HPO_4$  0,1 M, 0,4 ml NaOH 1 M, 10 ml *ethyl acetate* pada setiap tabung dan dikocok selama 30 detik.
- e) Sentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm (3000 g,  $r = 10$  cm) selama 10 menit pada suhu (20 °C sampai dengan 25 °C).
- f) Pindahkan 5 ml *ethyl acetate* (lapisan atas) ke dalam tabung sentrifus baru, kemudian dievaporasi dengan menggunakan *nitrogen evaporator* pada suhu 50 °C sampai dengan 60 °C.
- g) Larutkan endapan (hasil evaporasi) yang telah mengering dengan 1 ml *n-Hexane* kemudian kocok selama 30 detik dengan menggunakan *mini mixer* dan tambahkan 0,5 ml 2x *concentrated extraction solution* kemudian dikocok kembali selama 30 detik.
- h) Sentrifugasi dengan kecepatan 4500 rpm (3000 g,  $r = 10$  cm) selama 10 menit pada suhu (20 °C sampai dengan 25 °C).
- i) Ambil 50  $\mu$ l larutan pada lapisan *buffer* (lapisan bawah) untuk analisa ELISA.

**CATATAN** Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh digambarkan pada Lampiran B.

## 6.3 Proses pengujian ELISA

- a) Masukkan 50  $\mu$ l masing-masing larutan standar AHD ke dalam beberapa *well*, dengan susunan standar dari konsentrasi terendah hingga tertinggi (Tabel C.1).
- b) Masukkan 50  $\mu$ l masing-masing ekstrak contoh ke dalam *well* yang berbeda pula.
- c) Tambahkan 50  $\mu$ l *antibody solution* ke dalam setiap *well* pada poin a dan b.
- d) Inkubasikan *microtiter plate* dalam inkubator selama 30 menit pada suhu 37 °C.
- e) Buang cairan dari dalam *microtiter plate* dan ketukkan *microtiter plate* dengan keras secara terbalik pada alas yang dilapisi kertas tisu.
- f) Bilas *microtiter plate* dengan 250  $\mu$ l 20x *concentrated wash solution* sebanyak lima kali.
- g) Tambahkan 100  $\mu$ l *enzyme conjugated* dan inkubasikan kembali selama 30 menit pada suhu 37 °C.
- h) Buang cairan dari dalam *microtiter plate* sampai benar-benar kering dengan cara mengetukkan *microtiter plate* dengan keras secara terbalik pada alas yang dilapisi kertas tisu.
- i) Cuci *microtiter plate* dengan 250  $\mu$ l 20x *concentrated wash solution* sebanyak lima kali.
- j) Tambahkan 50  $\mu$ l larutan *solution A* kemudian 50  $\mu$ l larutan *solution B* ke dalam setiap *well*.
- k) Homogenkan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual dan inkubasikan dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 15 menit kondisi gelap.
- l) Tambahkan 50  $\mu$ l *stop solution* ke dalam setiap *well*, dan homogenkan secara perlahan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual.
- m) Baca absorbansi setiap sumuran dengan *microtiter plate reader* (ELISA reader) pada panjang gelombang 450 nm dengan segera (tidak lebih dari 30 menit).

**CATATAN** Posisi standar AHD dan contoh pada *well* digambarkan pada Lampiran C.1.



## 7 Perhitungan

- a) Kurva kalibrasi standar AHD dapat dibuat dari pembacaan % absorbansi setiap standar dengan konsentrasi standar dalam ng/ml pada kurva logaritma.

$$\frac{B}{B_0} \% = \frac{\text{Absorbansi standar atau contoh}}{\text{Absorbansi standar } 0 \text{ ng/ml}} \times 100 \%$$

- b) Masukkan hasil pembacaan % absorbansi contoh ke dalam kurva kalibrasi standar. (Gambar C.1).  
 c) Nilai konsentrasi AHD pada contoh diperoleh dari persamaan logaritma standar dalam nilai ng/g setelah dikalikan *dilution factor* 2,0.  
 d) *dilution factor* 2,0 merupakan faktor pengenceran dari 1 gram contoh dibagi dengan 0,5 ml 2x concentrated extraction solution.

**CATATAN** Kurva kalibrasi standar AHD digambarkan pada Lampiran C.2.

## 8 Pengendalian mutu

Pengendalian mutu yang digunakan dengan persyaratan sebagai berikut:

- a) bahan kimia berkualitas murni (*Grade Reagent* (G.R));  
 b) alat gelas bebas kontaminasi;  
 c) alat ukur yang telah dikalibrasi;  
 d) menyimpan bahan ELISA kit pada lemari pendingin dengan suhu 2 °C sampai dengan 8 °C;  
 e) kondisikan ELISA kit pada suhu kamar selama 30 menit sampai dengan 1 jam sebelum digunakan;  
 f) gunakan bahan analisa sebelum batas waktu kedaluwarsa.



**Lampiran A**  
(normatif)  
**Pembuatan larutan**

**A.1 Larutan *dipotassium hidrogen fosfat*,  $K_2HPO_4$  0,1 M**

Bahan:  
 $K_2HPO_4 \cdot H_2O$  G.R                      22,8 g  
 akuabides                                      1 l

Cara membuat :

Larutkan 22,8 g  $K_2HPO_4 \cdot H_2O$  G.R dalam 1 l akuabides.

**A.2 Larutan *asam klorida*, HCl 1 M**

Bahan:  
 HCl G.R (konsentrasi 36,5%)              8,6 ml  
 akuabides                                      91,4 ml

Cara membuat:

Encerkan 8,6 ml HCl G.R (konsentrasi 36.5%) dengan akuabides sampai volume 100 ml.

**A.3 Larutan *natrium hidroksida*, NaOH 1 M**

Bahan:  
 NaOH G.R                                      4 g  
 akuabides                                      100 ml

Cara membuat :

Larutkan 4 g NaOH G.R dalam 100 ml akuabides.

**A.4 Larutan *2-Nitrobenzaldehyde* 10 mM**

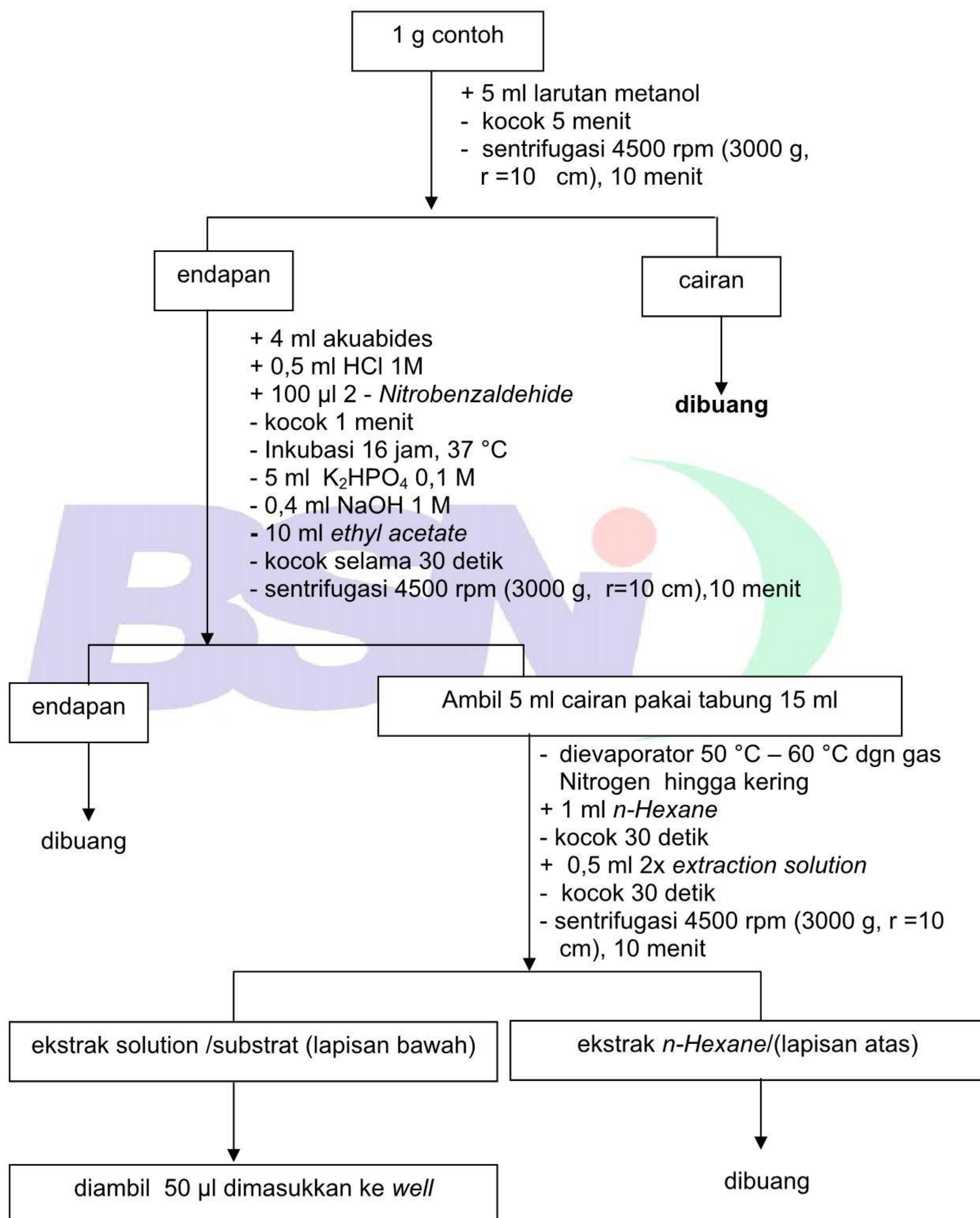
Bahan:  
 2-Nitrobenzaldehyde              15,1 mg  
 metanol                                      10 ml

Cara membuat:

Larutkan 15,1 mg 2-Nitrobenzaldehyde dalam 10 ml metanol.



**Lampiran B**  
(normatif)  
**Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis AHD**



**Gambar B.1 - Bagan alir preparasi dan ekstraksi contoh untuk analisis AHD**



### Lampiran C (normatif)

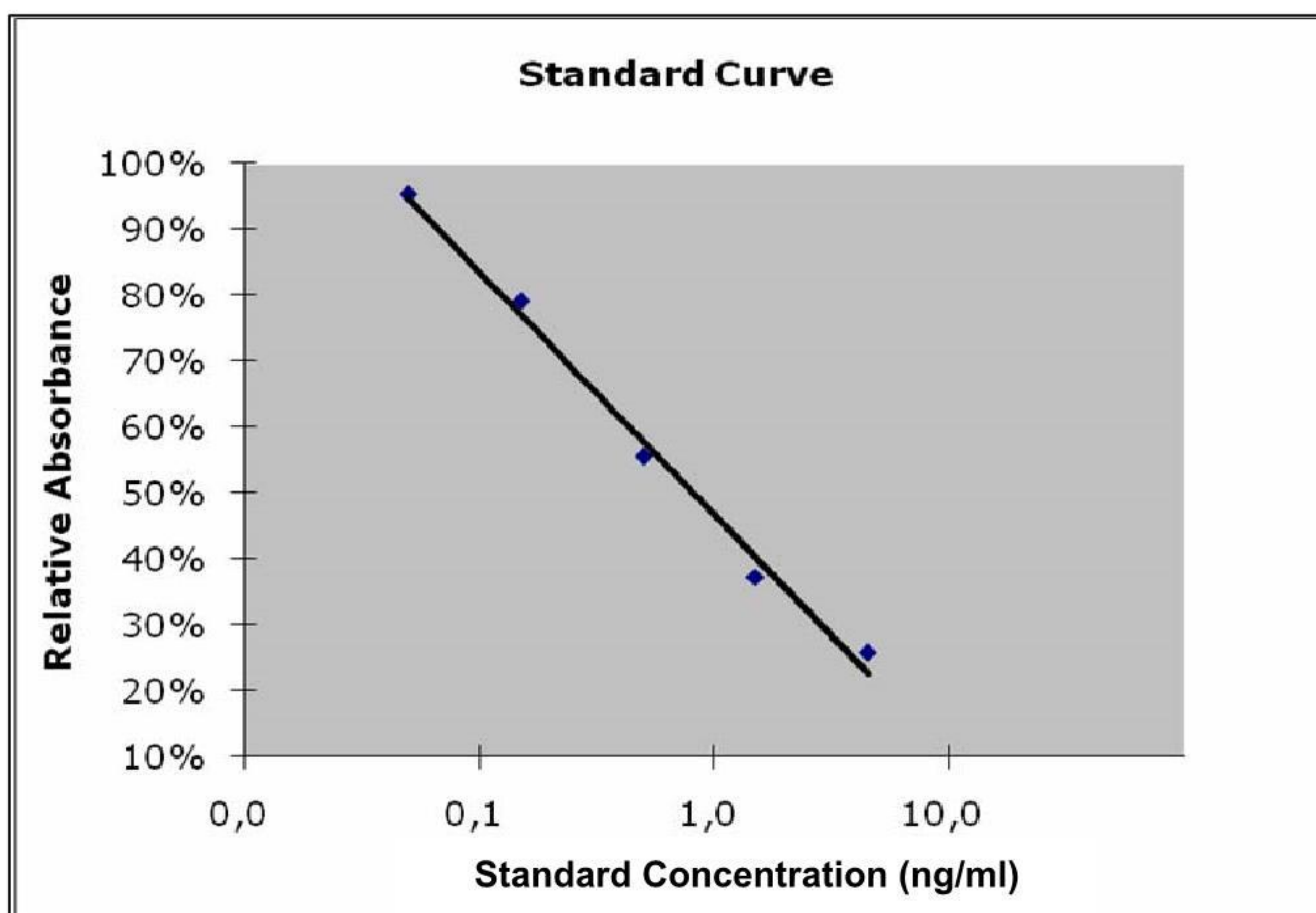
#### Posisi standar AHD dan contoh pada well dan kurva kalibrasi standar AHD

##### C.1 Posisi standar AHD dan contoh pada well

Tabel C.1 – Susunan standar AHD dan contoh dalam well

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S-0	S-2,7	C-3	C-7	C-11	C-15	C-19	C-23	C-27	C-31	C-35	C-39
B	S-0	S-2,7	C-3	C-7	C-11	C-15	C-19	C-23	C-27	C-31	C-35	C-39
C	S-0,1	S-8,1	C-4	C-8	C-12	C-16	C-20	C-24	C-28	C-32	C-36	C-40
D	S-0,1	S-8,1	C-4	C-8	C-12	C-16	C-20	C-24	C-28	C-32	C-36	C-40
E	S-0,3	C-1	C-5	C-9	C-13	C-17	C-21	C-25	C-29	C-33	C-37	C-41
F	S-0,3	C-1	C-5	C-9	C-13	C-17	C-21	C-25	C-29	C-33	C-37	C-41
G	S-0,9	C-2	C-6	C-10	C-14	C-18	C-22	C-26	C-30	C-34	C-38	C-42
H	S-0,9	C-2	C-6	C-10	C-14	C-18	C-22	C-26	C-30	C-34	C-38	C-42
<b>Keterangan :</b> S : kode larutan standar AHD (0; 0,1; 0,3; 0,9; 2,7; dan 8,1) ng/ml C : kode larutan contoh (C1 – C42) Lajur A-H : posisi well vertikal Lajur 1-12 : posisi well horisontal												

##### C.2 Kurva kalibrasi standar AHD



Gambar C.1 - Kurva kalibrasi standar AHD



## Bibliografi

Burgess, Graham, W. 1988. *Elisa Technology in Diagnosis and Research*. James Cook University of North Queensland.

Hadyana, Pudjaatmaka, A. 2002. *Kamus Kimia*. Balai Pustaka.

Wanger AHD Kit *Manual Catalog* H-080614-D10.















**BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN**  
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3-4  
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270  
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : [bsn@bsn.go.id](mailto:bsn@bsn.go.id)